

10/532412

27:11.03

PCT/JP03/15170

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

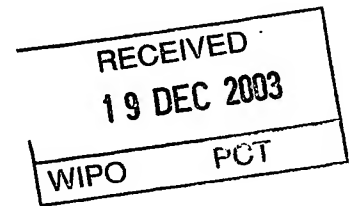
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年11月29日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-346796
[ST. 10/C]: [JP2002-346796]

出 願 人
Applicant(s): エーザイ株式会社
メルシャン株式会社

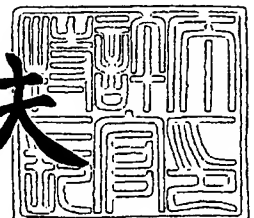


PRIORITY
DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003年10月30日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



BEST AVAILABLE COPY

出証番号 出証特2002-2000101

【書類名】 特許願

【整理番号】 102EZ006

【提出日】 平成14年11月29日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 C12P 1/00
C12N 1/00

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市松代1-14-11 サンヒルズ松代3
03号

【氏名】 奥田 彰文

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県守谷市美園3-9-7

【氏名】 山本 聡司

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県つくば市松代5-6-3

【氏名】 酒井 孝

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市南区永田北2-23-1-408

【氏名】 竹田 晋

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県藤沢市鵠沼神明2-9-2

【氏名】 中島 崇

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市南区永田みなみ台1-6-601

【氏名】 金子 桂

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県藤沢市藤沢1-3-7-501

【氏名】 鮫島 朋宏

【特許出願人】

【識別番号】 000000217

【氏名又は名称】 エーザイ株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000001915

【氏名又は名称】 メルシャン株式会社

【代理人】

【識別番号】 100063897

【弁理士】

【氏名又は名称】 古谷 馨

【電話番号】 03(3663)7808

【選任した代理人】

【識別番号】 100076680

【弁理士】

【氏名又は名称】 溝部 孝彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100087642

【弁理士】

【氏名又は名称】 古谷 聡

【選任した代理人】

【識別番号】 100091845

【弁理士】

【氏名又は名称】 持田 信二

【選任した代理人】

【識別番号】 100098408

【弁理士】

【氏名又は名称】 義経 和昌

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010685

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

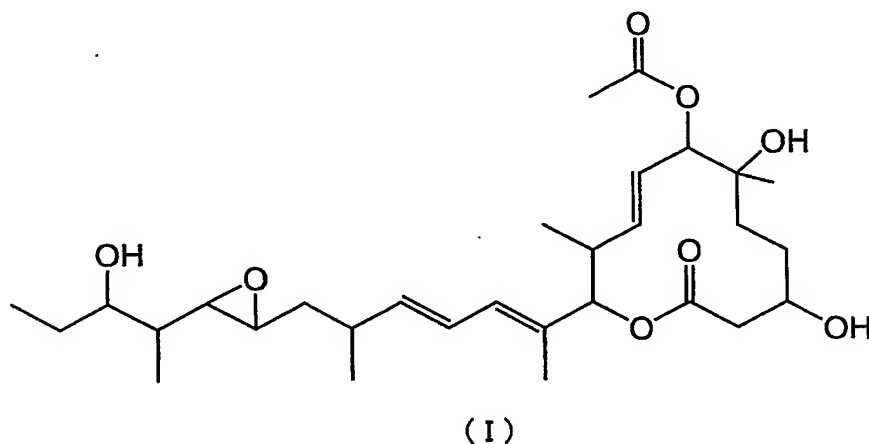
【書類名】 明細書

【発明の名称】 マクロライド系化合物の製造方法

【特許請求の範囲】

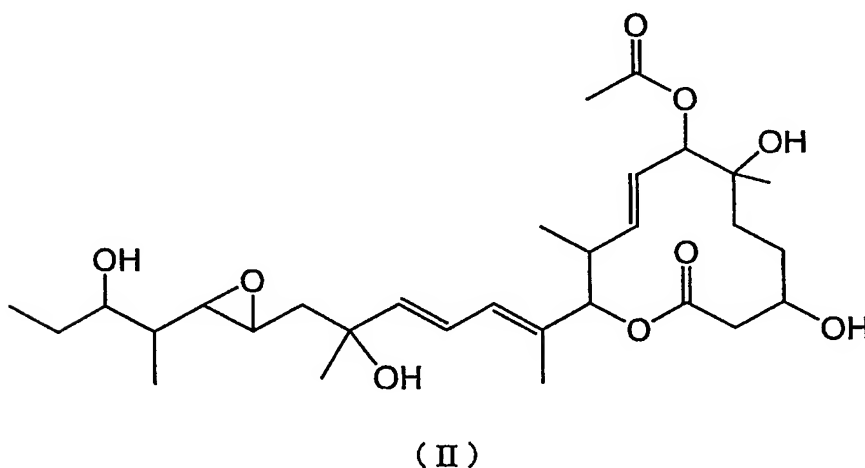
【請求項1】 式(I)

【化1】



で示されるマクロライド系化合物11107B物質の、式(II)

【化2】



で示されるマクロライド系化合物11107D物質への生物学的変換方法による、式(I)で示されるマクロライド系化合物11107D物質の製造方法であって、下記工程(A)及び(B)を含むことを特徴とする製造方法。

(A) 前記生物学的変換方法を行いうるものであって、かつ、ストレプトミセス(*Streptomyces*)属に属する菌株またはその培養菌体の調製物の存在下で、式(I)

) で示されるマクロライド系化合物11107B物質をインキュベーション処理する工程。

(B) 工程 (A) で得られるインキュベーション処理液から式(II)で示されるマクロライド系化合物11107D物質を採取する工程。

【請求項2】 前記ストレプトミセス属に属する菌株がストレプトミセス エスピー (*Streptomyces* sp.) AB-1704株 (FERM P-18999)、A-1544株 (FERM P-18943) または A-1545株 (FERM P-18944) である請求項1記載の製造方法。

【請求項3】 前記式 (I) で示されるマクロライド系化合物11107B物質から前記式(II)で示されるマクロライド系化合物11107D物質への変換能を有する、ストレプトミセス エスピー (*Streptomyces* sp.) AB-1704株 (FERM P-18999)。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、抗腫瘍活性を有する12員環マクロライド系化合物11107D物質の生物学的変換による製造方法およびそれに用いられる新規菌株に関する。

【0002】

【従来の技術】

12員環マクロライド系化合物11107D物質は、優れた抗腫瘍活性を有する12員環マクロライド系化合物であり、11107B物質とともにストレプトミセス エスピー (*Streptomyces* sp.) Mer-11107株の培養物より見出されたものである (特許文献1 参照)。11107D物質は、11107B物質の16位水酸化体に相当するが、その生産性は11107B物質の生産性よりも少なく、効率的な製造方法の確立が望まれていた。

【0003】

【特許文献1】

国際公開第02/060890号パンフレット

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、マクロライド系化合物11107B物質を出発原料とした、生物学的変換方法によるマクロライド系化合物11107D物質の新規な製造方法を提供する

ことにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために広範な微生物群からマクロライド系化合物11107B物質の16位水素原子を水酸基に変換しうる微生物のスクリーニングを試みたところ、放線菌に分類されるストレプトミセス(*Streptomyces*)属に属する菌株が前記変換能を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

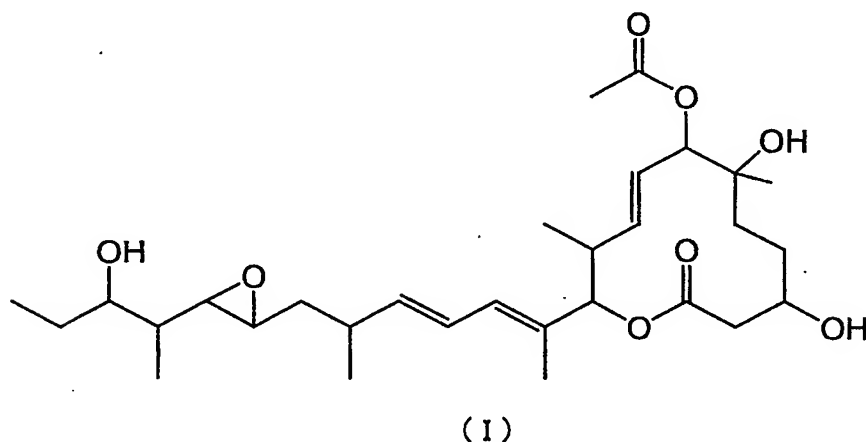
【0006】

即ち本発明は、以下の(1)～(3)に関する。

(1) 式(I)

【0007】

【化3】

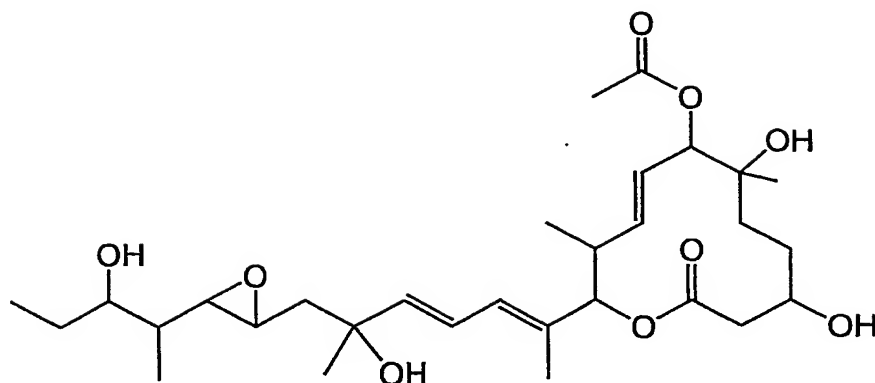


【0008】

で示されるマクロライド系化合物11107B物質の、式(II)

【0009】

【化 4】



(II)

【0010】

で示されるマクロライド系化合物11107D物質への生物学的変換方法による、式(I)で示されるマクロライド系化合物11107D物質の製造方法であって、下記工程(A)及び(B)を含むことを特徴とする製造方法。

(A) 前記生物学的変換方法を行いうるものであって、かつ、ストレプトミセス(*Streptomyces*)属に属する菌株またはその培養菌体の調製物の存在下で、式(I)で示されるマクロライド系化合物11107B物質をインキュベーション処理する工程。

(B) 工程(A)で得られるインキュベーション処理液から式(II)で示されるマクロライド系化合物11107D物質を採取する工程。

【0011】

(2) 前記ストレプトミセス属に属する菌株がストレプトミセス エスピー(*Streptomyces* sp.) AB-1704株(FERM P-18999)、A-1544株(FERM P-18943)またはA-1545株(FERM P-18944)である前記(1)記載の製造方法。

【0012】

(3) 前記式(I)で示されるマクロライド系化合物11107B物質から前記式(I)で示されるマクロライド系化合物11107D物質への変換能を有する、ストレプトミセス エスピー(*Streptomyces* sp.) AB-1704株(FERM P-18999)。

【0013】

【発明の実施の形態】

本発明の生物学的変換方法では、ストレプトミセス(*Streptomyces*)属に属する微生物であって、前記式(I)で示されるマクロライド系化合物11107B物質から前記式(II)で示されるマクロライド系化合物11107D物質へ変換する能力を有する微生物であれば、種および株の種類を問うことなく使用できるが、好ましい微生物として、いずれも土壌から分離されたストレプトミセス エスピー(*Streptomyces* sp.) AB-1704株、A-1544株またはA-1545株を挙げることができる。

【0014】

ストレプトミセス エスピー(*Streptomyces* sp.) AB-1704株は、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに平成14年9月5日付けで*Streptomyces* sp. AB-1704として寄託されている(受託番号 FERM P-18999)。また、A-1544株、A-1545株は、同じく独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センターに平成14年7月23日付けでそれぞれA-1544およびA-1545として寄託されている(受託番号 FERM P-18943およびFERM P-18944)。

【0015】

なお、上記菌株の菌学的性状は次のとおりである。

[AB-1704株の菌学的性状]**(1) 形態**

基生菌糸より直状(*Rectiflexibiles* type)の気中菌糸を伸長する。成熟した気中菌糸の先に20~50個程度の円筒形の孢子からなる孢子鎖を形成する。孢子の大きさは $0.6\sim 0.8\times 1.0\sim 1.1\mu\text{m}$ 位で、孢子の表面は平滑状(smooth)を示し、孢子のう、菌核、鞭毛などの特殊な器官は認められない。

【0016】**(2) 各種培地における生育状態**

各種培地上で28℃、約2週間培養後の培養性状を表1に示す。色調の記載はコンティナー・コーポレーション・オブ・アメリカのカラー・ハーモニー・マニュアル(Container Corporation of America の Color Harmony Manual)の色標名と括弧内に示す符号で表示する。

【0017】

【表1】

培 地	生育	気菌糸	基生菌糸の色	可溶性色素
イースト・麦芽寒天培地 (ISP-2)	良好	厚く Ivory (2db)	Nude tan (4gc)	なし
オートミール寒天培地 (ISP-3)	良好	豊富 Ivory (2db)	Light melon yellow (3ea)	なし
スターチ・無機塩寒天培地 (ISP-4)	良好	厚く Putty~Ivory (1 1/2ec~2db)	Cork tan (4ie)	なし
グリセリン・アスパラギン寒天培地 (ISP-5)	良好	厚く Parchment (1 1/2db)	Nude tan (4gc)	なし
ペプトン・イースト・鉄寒天培地 (ISP-6)	良好	豊富 White (a)	Light melon yellow (3ea)	なし
チロシン寒天培地 (ISP-7)	良好	厚く Ivory (2db)	Nude tan (4gc)	なし

【0018】

(3) 各種炭素源の同化性

プリードハム・ゴトリーブ寒天培地に各種の炭素源を加え、28℃、培養2週間後の生育状況を表2に示す。

【0019】

【表2】

D-グルコース	+	イノシトール	-
L-アラビノース	±	L-ラムノース	+
D-キシロース	+	D-マンニトール	+
D-フルクトース	+	D-ラフィノース	-
シュークロース	±		

+: 同化する、±: 多少同化する、-: 殆ど同化しない

【0020】

(4) 生理学的諸性質

本菌の生理学的諸性質は以下の通りである。

- (a) 生育温度範囲(イースト・麦芽寒天培地、2週間培養)：5℃～33℃
- (b) 生育至適温度(イースト・麦芽寒天培地、2週間培養)：15℃～33℃
- (c) ゼラチンの液化(グルコース・ペプトン・ゼラチン培地)：陽性
- (d) ミルクの凝固(スキムミルク培地)：陽性
- (e) ミルクのペプトン化(スキムミルク培地)：陽性
- (f) スターチの加水分解(スターチ・無機塩寒天培地)：陽性
- (g) メラニン様色素の産生(ペプトン・イースト・鉄寒天培地)：陰性
(チロシン培地)：陰性
- (h) 硫化水素の産生(ペプトン・イースト・鉄寒天培地)：陰性
- (i) 硝酸塩の還元(0.1%硝酸カリ含有プロス)：陽性
- (j) 食塩の耐性(イースト・麦芽寒天培地、2週間培養)：食塩含有量7%以下で生育

【0021】

(5) 菌体成分

本菌の細胞壁からLL型のジアミノピメリン酸が検出された。

以上の菌学的性質から本発明者らは本菌株がストレプトミセス (Streptomyces) 属に属すると判断した。

【0022】

[A-1544株の菌学的性状]

(1) 形態

基生菌糸より螺旋状(Spira type)の気中菌糸を伸長する。成熟した気中菌糸の先に10～20個程度の円筒形の孢子からなる孢子鎖を形成する。孢子の大きさは1.0×1.2～1.4μm位で、孢子の表面はトゲ状(spiny)を示し、孢子のう、菌核、鞭毛などの特殊な器官は認められない。

【0023】

(2) 各種培地における生育状態

各種培地上で28℃、約2週間培養後の培養性状を表3に示す。色調の記載はコンティナー・コーポレーション・オブ・アメリカのカラー・ハーモニー・マニユ

アル (Container Corporation of America の Color Harmony Manual) の色標名と括弧内に示す符号で表示する。

【0024】

【表3】

培 地	生育	気菌系	基生菌系の色	可溶性色素
イースト・麦芽寒天培地 (ISP-2)	良好	厚く Silver gray (3fe)	Light melon yellow (3ea)	なし
オートミール寒天培地 (ISP-3)	良好	豊富 Light gray ～Silver gray (d～3fe)	Light melon yellow (3ea)	なし
スターチ・無機塩寒天培地 (ISP-4)	良好	豊富 Silver gray (3fe)	Light melon yellow (3ea)	なし
グリセリン・アスパラギン寒天培地 (ISP-5)	良好	豊富 Ashes (5fe)	Light melon yellow (3ea)	なし
ペプトン・イースト・鉄寒天培地 (ISP-6)	良好	なし	Light melon yellow (3ea)	薄い 黒褐色
チロシン寒天培地 (ISP-7)	良好	豊富 Covert gray (2fe)	Light melon yellow (3ea)	なし

【0025】

(3) 各種炭素源の同化性

プリードハム・ゴトリーブ寒天培地に各種の炭素源を加え、28℃、培養2週間後の生育状況を表4に示す。

【0026】

【表 4】

D-グルコース	+	イノシトール	-
L-アラビノース	+	L-ラムノース	+
D-キシロース	+	D-マンニトール	+
D-フルクトース	+	D-ラフィノース	-
シュークロース	-		

+: 同化する、±: 多少同化する、-: 殆ど同化しない

【0027】

(4) 生理学的諸性質

本菌の生理学的諸性質は以下の通りである。

- (a) 生育温度範囲(イースト・麦芽寒天培地、2週間培養): 15℃～41℃
- (b) 生育至適温度(イースト・麦芽寒天培地、2週間培養): 20℃～37℃
- (c) ゼラチンの液化(グルコース・ペプトン・ゼラチン培地): 陽性
- (d) ミルクの凝固(スキムミルク培地): 陽性
- (e) ミルクのペプトン化(スキムミルク培地): 陽性
- (f) スターチの加水分解(スターチ・無機塩寒天培地): 陽性
- (g) メラニン様色素の産生(ペプトン・イースト・鉄寒天培地): 陽性
(チロシン培地): 陰性
- (h) 硫化水素の産生(ペプトン・イースト・鉄寒天培地): 陽性
- (i) 硝酸塩の還元(0.1%硝酸カリ含有ブロス): 陰性
- (j) 食塩の耐性(イースト・麦芽寒天培地、2週間培養): 食塩含有量7%以下で
生育

【0028】

(5) 菌体成分

本菌の細胞壁からLL型のジアミノピメリン酸が検出された。

以上の菌学的性質から本発明者らは本菌株がストレプトミセス (Streptomyces) 属に属すると判断した。

【0029】

[A-1545株の菌学的性状]

(1) 形態

基生菌糸より直状(Rectiflexibiles type)の気中菌糸を伸長する。成熟した気中菌糸の先に50個以上の胞子からなる胞子鎖を形成する。胞子の大きさは $0.8 \times 1.0 \mu\text{m}$ 位で、胞子の表面は平滑状(smooth)を示し、胞子のう、菌核、鞭毛などの特殊な器官は認められない。

【0 0 3 0】

(2) 各種培地における生育状態

各種培地上で28℃、約2週間培養後の培養性状を表5に示す。色調の記載はコンテナー・コーポレーション・オブ・アメリカのカラー・ハーモニー・マニュアル(Container Corporation of America の Color Harmony Manual)の色標名と括弧内に示す符号で表示する。

【0 0 3 1】

【表 5】

培 地	生育	気菌糸	基生菌糸の色	可溶性色素
イースト・麦芽寒天培地 (ISP-2)	良好	豊富 Grayish yellowish pink (5cb)	Light melon yellow ~Nude tan (3ea~4gc)	なし
オートミール寒天培地 (ISP-3)	中程度	うっすら Grayish yellowish pink (5cb)	Pearl pink (3ca)	なし
スターチ・無機塩寒天培地 (ISP-4)	良好	うっすら Grayish yellowish pink (5cb)	Light Ivory (2ca)	なし
グリセリン・アスパラギン寒天培地 (ISP-5)	良好	豊富 Grayish yellowish pink (5cb)	Pearl pink (3ca)	なし
ペプトン・イースト・鉄寒天培地 (ISP-6)	中程度	なし	Light melon yellow (3ea)	なし
チロシン寒天培地 (ISP-7)	良好	豊富 Grayish yellowish pink (5cb)	Light melon yellow (3ea)	なし

【0032】

(3) 各種炭素源の同化性

ブリードハム・ゴトリープ寒天培地に各種の炭素源を加え、28℃、培養2週間後の生育状況を表6に示す。

【0033】

【表 6】

D-グルコース	+	イノシトール	±
L-アラビノース	+	L-ラムノース	+
D-キシロース	+	D-マンニトール	+
D-フルクトース	+	D-ラフィノース	+
シュークロース	-		

+: 同化する、±: 多少同化する、-: 殆ど同化しない

【0 0 3 4】

(4) 生理学的諸性質

本菌の生理学的諸性質は以下の通りである。

- (a) 生育温度範囲(イースト・麦芽寒天培地、2週間培養): 10℃～37℃
- (b) 生育至適温度(イースト・麦芽寒天培地、2週間培養): 20℃～33℃
- (c) ゼラチンの液化(グルコース・ペプトン・ゼラチン培地): 陰性
- (d) ミルクの凝固(スキムミルク培地): 陽性
- (e) ミルクのペプトン化(スキムミルク培地): 陽性
- (f) スターチの加水分解(スターチ・無機塩寒天培地): 陽性
- (g) メラニン様色素の産生(ペプトン・イースト・鉄寒天培地): 陰性
(チロシン培地): 陰性
- (h) 硫化水素の産生(ペプトン・イースト・鉄寒天培地): 陽性
- (i) 硝酸塩の還元(0.1%硝酸カリ含有ブロス): 陰性
- (j) 食塩の耐性(イースト・麦芽寒天培地、2週間培養): 食塩含有量7%以下で
生育

【0 0 3 5】

(5) 菌体成分

本菌の細胞壁からLL型のジアミノピメリン酸が検出された。

以上の菌学的性質から本発明者らは本菌株がストレプトミセス (Streptomyces) 属に属すると判断した。

【0 0 3 6】

本発明によれば、まず工程（A）において、前記菌株またはその培養菌体調製物、さらに酸素の存在下で、出発原料(基質)であるマクロライド系化合物11107B物質がインキュベーション処理される。この処理は前記菌株を好氣的条件下で培養する際に、その培養液中に基質を添加して行うか、あるいは場合により前記菌株の培養菌体を、例えばそのまま、もしくはホモジナイズした調製物の懸濁液中に基質を添加し、酸素を含む気体、例えば空気を通気しながらインキュベーションして行うこともできる。

【0037】

培養液への基質の添加は、培養前または培養開始後一定期間経過したときのいずれの時期に行ってもよい。上記菌体は上記いずれかの菌株を栄養源含有培地に接種し、好氣的に培養することにより製造できる。かかる培養菌体の調製物を用意するための菌株の培養または基質が添加された状態で行われる菌株の培養は、原則的には一般微生物の培養方法に準じて行うことができるが、通常は液体培養による振とう培養、通気攪拌培養などの好氣的条件下で実施するのが好ましい。

【0038】

培養に用いられる培地としては、ストレプトミセス(*Streptomyces*)属に属する微生物が利用できる栄養源を含有する培地であればよく、各種の合成培地、半合成培地、天然培地などいずれも利用可能である。培地組成としては炭素源としての、グルコース、ガラクトース、シュクロース、マルトース、フルクトース、グリセリン、デキストリン、澱粉、糖蜜、大豆油等を単独または組み合わせて用いることができる。

【0039】

窒素源としては、ファルマメディア、ペプトン、肉エキス、大豆粉、魚粉、グルテンミール、カゼイン、乾燥酵母、アミノ酸、酵母エキス、NZ-case、尿素等の有機窒素源、硝酸ナトリウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を単独または組み合わせて用いる。その他、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸カルシウム、硫酸マグネシウム、磷酸ナトリウム、磷酸カリウム、硫酸銅、硫酸鉄、塩化マンガン、塩化コバルト等の塩類、重金属類塩、ビタミンBおよびビオチン等のビタミン類、シクロデキストリン類のような包接剤も必要に応じ添加使

用することができる。なお、培養中発泡が著しい場合には、各種消泡剤を適宜培地中に添加することができる。消泡剤の添加にあたっては目的物質の生産に悪影響を与えない濃度とする必要がある。

【0040】

培養条件は該菌株が良好に生育して上記物質を生産し得る範囲内で適宜選択し得る。例えば培地のpHは5～9程度、通常中性付近とするのが望ましい。培養温度は、通常20～40℃、好ましくは24～30℃に保つのが良い。培養日数は1～8日程度で、通常2～5日程度である。上述した各種の培養条件は、使用微生物の種類や特性、外部条件等に応じて適宜変更でき、最適条件を選択できるのはいくつでもない。

【0041】

また、培養菌体調製物は、培養終了後、遠心分離または濾過により分離した菌体またはホモジナイズした菌体を適当な溶液に懸濁して調製する。菌体の懸濁に使用できる溶液は、前記した培地であるか、あるいはトリス酢酸、トリス塩酸、コハク酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウムなどの緩衝液を単独または混合したものである。緩衝液のpHは、5.0～9.0、好ましくは6.0～7.5である。

【0042】

基質となる11107B物質は、粉末のままか、あるいは水溶性有機溶媒、例えばエタノールなどに溶解して培養液または菌体の懸濁液に添加することができ、その添加量は、例えば、培養液の場合、培養液1L当り50～2000mgが好ましい。基質添加後は、27～31℃で約1～3日間、振とうあるいは通気攪拌などの操作を行い、好氣的条件下で反応を進行させることにより基質である11107B物質を目的の11107D物質に変換することができる。

【0043】

次に、工程(B)において、前記工程(A)で得られたインキュベーション処理液から目的の11107D物質を採取する。11107D物質を工程(A)の反応混合物から単離するには、一般に微生物代謝産物を単離するために用いられる種々の既知精製手段を選択、組合せて行うことができる。例えば、メタノール、エタノール

、ブタノール、アセトン、酢酸エチル、酢酸ブチル、クロロホルム、トルエン等を用いた有機溶媒抽出、各種のイオン交換クロマトグラフィー、セファデックス LH-20等を用いたゲル濾過クロマトグラフィー、ダイヤイオン HP-20等の疎水性吸着樹脂、活性炭、シリカゲル等による吸着クロマトグラフィー、もしくは薄層クロマトグラフィーによる吸脱着処理、あるいは逆相カラム等を用いた高速液体クロマトグラフィー等を、単独あるいは適宜組合せ、場合により反復使用することにより、分離精製することができる。

【0044】

【実施例】

以下、本発明について具体例を挙げてより詳細に説明するが、本発明をこれらの例に限定することを意図するものではない。なお、下記の例中のパーセント(%)は、特に断りのない限り、重量パーセント(%(w/v))を示す。

【0045】

参考例1(原料である11107B物質の製造)

ストレプトミセス エスピー(*Streptomyces* sp.) Mer-11107株(FERM BP-7812)の斜面培養(ISP-2培地)から1白金耳を50mlの種母培地[グルコース2%、エサニンミート(味の素(株)製)1%、酵母エキス(オリエンタル酵母工業(株)製)0.5%、塩化ナトリウム0.25%、炭酸カルシウム0.32%、殺菌前pH6.8]を入れた500ml容の三角フラスコに接種し、28℃で2日間培養して第一段種母培養液を得た。この培養液0.1mlを同じ種母培地100mlを入れた500ml容の三角フラスコに接種し、28℃で1日間培養して第二段種母培養液を得た。このようにして得た第二段種母培養液800mlを生産培地[可溶性澱粉5%、ファルマメディア0.8%、グルテンミール0.8%、酵母エキス0.5%、炭酸カルシウム0.1%、殺菌前pH6.8]100Lを入れた200Lタンクに接種し、培養温度28℃で攪拌数90rpm、通気量1.0vvm、内圧20kPaの条件で5日間通気攪拌培養を行って培養液を得た。

【0046】

このようにして得た培養液の一部(10L)を10Lの1-ブタノールにて抽出後、ブタノール層を減圧乾固し、100gの粗活性画分を得た。この粗活性画分をセファデックス LH-20(ファルマシア社製、1500 ml)上に添加し、テトラヒドロフラン

ーメタノール(1:1)の溶媒で溶出した。540 mlから660 mlまでに溶出した画分を減圧下で濃縮乾固し、残渣(660 mg)を得た。さらにこの残渣を酢酸エチルおよびメタノール(9:1;v/v)の混液に溶解し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー(ワコーゲルC-200、50 g)に付した。このカラムをn-ヘキサンおよび酢酸エチル(1:9;v/v)の混液(2 L)で溶出し、468 mlから1260 mlまでに溶出した画分を集め、減圧下で濃縮し、粗活性画分を25mg得た。

【0047】

得られた粗活性画分を下記のHPLC分取条件(A)で分取高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に付し、保持時間34分に溶出される画分を集め、アセトニトリルを留去後、下記HPLC分取条件(B)にてその画分をHPLCによる脱塩を行うことにより11107B物質(保持時間：37分)を6 mg得た。

【0048】

HPLC分取条件(A)

カラム：YMC-PACK ODS-AM SH-343-5AM, ϕ 20mm×250mm(ワイエムシー社製)

温度：室温

流速：10ml/分

検出：240nm

溶出液：アセトニトリル/0.15%リン酸二水素カリウム(pH3.5) (2:8~8:2, v/v, 0~50分, リニアグラジェント)

【0049】

HPLC分取条件(B)

カラム：YMC-PACK ODS-AM SH-343-5AM, ϕ 20mm×250mm(ワイエムシー社製)

温度：室温

流速：10ml/分

検出：240nm

溶出液：メタノール/水(2:8~10:0, v/v, 0~40分, リニアグラジェント)

【0050】

実施例1(試験管スケールにおけるAB-1704株による変換)

土壌から分離されたストレプトミセス エスピー(*Streptomyces* sp.) AB-1704

株(FERM P-18999)の斜面培地[可溶性澱粉0.5%、グルコース0.5%、魚肉エキス(和光純薬工業(株)製)0.1%、酵母エキス(オリエンタル酵母工業(株)製)0.1%、NZ-case(フムコ・シェフィールド・ケミカル社製)0.2%、塩化ナトリウム0.2%、炭酸カルシウム0.1%、寒天(和光純薬工業(株)製)1.6%]から1白金耳を7mlの種母培地[可溶性澱粉2.0%、グルコース1.0%、ポリペプトン(日本製薬(株)製)0.5%、酵母エキス(オリエンタル酵母工業(株)製)0.5%、炭酸カルシウム0.1%]を入れた65ml容の試験管に接種し、28℃で3日間振とう培養機上で培養して種母培養液を得た。

【0051】

さらに種母培養液0.5mlを7mlの生産培地[可溶性澱粉2.0%、グルコース1.0%、ポリペプトン(日本製薬(株)製)0.5%、酵母エキス(オリエンタル酵母工業(株)製)0.5%、炭酸カルシウム0.1%]の入った65ml容の試験管に植え継ぎ、28℃で3日間振とう培養機上で培養した。次に基質である11107B物質を25mg/mlエタノール溶液として調製し、0.2ml添加した。添加後、28℃で48時間振とうし、変換反応を行った。反応後、下記のHPLC分析条件(a)でHPLC分析を行い、反応混合物中に11107D物質が生成していることを確認した。

【0052】

HPLC分析条件(a)

カラム：CAPCELL PAK C18 SG120, ϕ 4.6mm×250mm(資生堂(株)製)

温度：40℃

流速：1 ml/分

検出：240nm

溶出液：アセトニトリル/0.15%リン酸二水素カリウム(pH3.5)(3:7~5:5, v/v, 0~18分, リニアグラジエント), アセトニトリル/0.15%リン酸二水素カリウム(pH3.5)(5:5~85:15, v/v, 18~22分, リニアグラジエント)

保持時間：11107D物質 9.9分、11107B物質 19.4分

【0053】

実施例2(試験管スケールにおけるA-1545株による変換)

土壌から分離されたA-1545株(FERM P-18944)の斜面培地(イースト・麦芽寒天

培地)から1白金耳を20mlの種母培地[可溶性澱粉2.4%、グルコース0.1%、大豆粉(エスサンミート、味の素(株)製)0.5%、牛肉エキス(Difco社製)0.3%、酵母エキス(Difco社製)0.5%、トリプトン・ペプトン(Difco社製)0.5%、炭酸カルシウム0.4%]を入れた250ml容の三角フラスコに接種し、28℃で3日間振とう培養機上で培養して種母培養液を得た。

【0054】

さらに種母培養液0.6mlを60mlの生産培地[可溶性澱粉2%、グルコース2%、大豆粉(エスサンミート、味の素(株)製)2%、酵母エキス(オリエンタル酵母工業(株)製)0.5%、塩化ナトリウム0.25%、炭酸カルシウム0.32%、硫酸銅0.0005%、塩化マンガン0.0005%、硫酸亜鉛0.0005%、殺菌前pH7.4]の入った500ml容の三角フラスコに植え継ぎ、28℃で4日間振とう培養機上で培養した。得られた培養液2mlを15ml試験管に分注した。次に基質である11107B物質を20mg/mlジメチルスルホキシド溶液として調製し、0.05ml添加した。添加後28℃で23時間振とうし、変換反応を行った。反応後、下記のHPLC分析条件(b)でHPLC分析を行い、反応混合物中に11107D物質が生成していることを確認した。

【0055】

HPLC分析条件(b)

カラム: CAPCELL PAK C18 SG120, $\phi 4.6 \times 250$ mm(資生堂(株)製)

温度: 40℃

流速: 1ml/分

検出: 240nm

溶出液: アセトニトリル/水(50:50, v/v)アイソクラテック

保持時間: 11107B物質 7.2分、11107D物質 3.6分

【0056】

実施例3(フラスコスケールにおけるAB-1704株による変換)

土壌から分離されたストレプトミセス エスピー(*Streptomyces* sp.) AB-1704株(FERM P-18999)の斜面培地[可溶性澱粉0.5%、グルコース0.5%、魚肉エキス(和光純薬工業(株)製)0.1%、酵母エキス(オリエンタル酵母工業(株)製)0.1%、NZ-case(フムコ・シェフィールド・ケミカル社製)0.2%、塩化ナトリウム0.

2%、炭酸カルシウム0.1%、寒天(和光純薬工業(株)製)1.6%]から1白金耳を100mlの種母培地[可溶性澱粉2.0%、グルコース1.0%、ポリペプトン(日本製薬(株)製)0.5%、酵母エキス(オリエンタル酵母工業(株)製)0.5%、炭酸カルシウム0.1%]を入れた500ml容の三角フラスコに接種し、28℃で3日間振とう培養機上で培養して種母培養液を得た。さらに100mlの生産培地[可溶性澱粉2.0%、グルコース1.0%、ポリペプトン(日本製薬(株)製)0.5%、酵母エキス(オリエンタル酵母工業(株)製)0.5%、炭酸カルシウム0.1%]の入った500ml容の三角フラスコ150本に種母培養液を2mlずつ植え継ぎ、28℃で2日間振とう培養機上で培養した。

【0057】

得られた培養液(100ml/500ml容三角フラスコ、150本)に、20mg/mlエタノール溶液として調製した、基質である11107B物質をそれぞれ0.44ml添加した。添加後、28℃で9時間振とうし、変換反応を行った。反応終了後、培養液を集め、2700rpm、10分間の遠心分離によって培養上清と菌体に分離した。菌体は5Lのメタノールで抽出後、ろ過してメタノール抽出液を得た。メタノール抽出液から減圧下でメタノールを留去した後、培養上清と合わせて、10Lの酢酸エチルにて抽出した。得られた酢酸エチル溶液を減圧下で濃縮し、2090mgの粗活性画分を得た。この粗活性画分をテトラヒドロフラン-メタノール(1:1, v/v)の混液4mlおよび50%アセトニトリル水溶液6mlに溶解し、ODSカラムクロマトグラフィー(ワイエムシー社製、ODS-AM 120-S50 ϕ 3.6cm \times 43cm)に付し、40%アセトニトリル水溶液で溶出した。336mlから408mlまでに溶出した画分を減圧下で濃縮乾固することにより560mgの残渣を得た。さらにこの残渣を50%メタノール水溶液10mlに溶解し、ODSカラムクロマトグラフィー(ワイエムシー社製ODS-AM 120-S50 ϕ 3.6cm \times 40cm)に付し、50%メタノール水溶液で溶出した。1344mlから1824mlまでに溶出した画分を減圧下で濃縮乾固することにより、11107D物質252mgを得た。

【0058】

実施例4(フラスコスケールにおけるA-1544株による変換)

A-1544株(FERM P-18943)の斜面培地(イースト・麦芽寒天培地)から1白金耳を25mlの種母培地[可溶性澱粉2%、グルコース2%、大豆粉(エスサンミート、味

の素(株)製)2%、酵母エキス(Difco社製)0.5%、塩化ナトリウム0.25%、炭酸カルシウム0.32%、殺菌前pH7.4]を入れた250ml容の三角フラスコに接種し、28℃で2日間振とう培養機上で培養して種母培養液を得た。この培養液0.75mlを2ml容のセラムチューブ(住友ベークライト(株)製)に分注し、同量の40%グリセロール水溶液を添加し、攪拌後-70℃で凍結し、凍結種母を作製した。この凍結種母を融解し、そのうち0.25mlを25mlの種母培地[可溶性澱粉2%、グルコース2%、大豆粉(エスサンミート、味の素(株)製)2%、酵母エキス(オリエンタル酵母工業(株)製)0.5%、塩化ナトリウム0.25%、炭酸カルシウム0.32%、殺菌前pH7.4]を入れた250ml容の三角フラスコに接種し、28℃で2日間振とう培養機上で培養して種母培養液を得た。さらに種母培養液0.5mlを100mlの生産培地[可溶性澱粉2%、グルコース2%、大豆粉(エスサンミート、味の素(株)製)2%、酵母エキス(オリエンタル酵母工業(株)製)0.5%、塩化ナトリウム0.25%、炭酸カルシウム0.32%、殺菌前pH7.4]の入った500ml容の三角フラスコに植え継ぎ、28℃で3日間振とう培養機上で培養した。

【0059】

得られた培養液(100ml/500ml容三角フラスコ、10本)、それぞれについて3000rpm、10分間の遠心分離を行い集菌し、50mMリン酸緩衝液(pH6.0)100mlに懸濁した。次に基質である11107B物質を100mg/mlジメチルスルホキシド溶液として調製し、それぞれ0.5ml添加した。添加後、28℃で24時間振とうし、変換反応を行った。反応終了後、反応液を集め、5000rpm、20分間の遠心分離によって、上清と菌体に分離した。上清は1Lの酢酸エチルにて抽出した。菌体は500mlのメタノールで抽出後、ろ過してメタノール抽出液を得た。メタノール抽出液を減圧下でメタノールを留去した後、1Lの酢酸エチルで抽出した。それぞれの酢酸エチル層を水洗し、無水硫酸ナトリウムにて脱水乾燥後、合わせて減圧下で濃縮し、937mgの粗活性画分を得た。この粗活性画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Kiesel gel 60, 50g)に付し、酢酸エチルおよびn-ヘキサン(90:10; v/v)の混液1200mlで溶出し、活性画分234mgを得た。得られた活性画分を下記分取条件(C)で分取高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に付し、得られる溶出液を下記の分析条件(c)でHPLC分析した。こうして得られた11107D物質を含む画分から、溶媒を

留去することにより、11107D物質80mgを得た。

【0060】

HPLC分取条件(C)

カラム: CAPCELL PAK C18 UG120, ϕ 30×250mm(資生堂(株)製)

流速: 20ml/分

検出: 240nm

溶出液: アセトニトリル/水(30:70, v/v)アイソクラテック

【0061】

HPLC分析条件(c)

カラム: CAPCELL PAK C18 SG120, ϕ 4.6×250mm(資生堂(株)製)

温度: 40℃

流速: 1ml/分

検出: 240nm

溶出液: アセトニトリル/水(35:65, v/v)アイソクラテック

保持時間: 11107D物質 7.8分

【0062】

実施例5(フラスコスケールにおけるA-1545株による変換)

実施例4と同様の方法にて得られたA-1545株(FERM P-18944)の培養液(100ml/500ml容三角フラスコ、10本)、それぞれについて、3000rpm、10分間の遠心分離を行い集菌し、50mMリン酸緩衝液(pH6.0)100mlに懸濁した。次に基質である11107B物質を100mg/mlジメチルスルホキシド溶液として調製し、それぞれ1ml添加した。添加後、28℃で24時間振とうし、変換反応を行った。反応終了後、反応液を集め、5000rpm、20分間の遠心分離によって、上清と菌体に分離した。上清は1Lの酢酸エチルにて抽出した。菌体は500mlのアセトンで抽出後、ろ過してアセトン抽出液を得た。アセトン抽出液を減圧下でアセトンを留去した後、1Lの酢酸エチルで抽出した。それぞれの酢酸エチル層を水洗し、無水硫酸ナトリウムにて脱水乾燥後、合わせて減圧下で濃縮し、945mgの粗活性画分を得た。この粗活性画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Kiesel gel 60, 50g)に付し、酢酸エチルおよびn-ヘキサン(50:50; v/v)の混液100ml、酢酸エチルおよびn-ヘ

キサン(75:25; v/v)の混液200ml、酢酸エチルおよびn-ヘキサン(90:10; v/v)の混液(600ml)で溶出し、活性画分463mgを得た。得られた活性画分を実施例4記載の分取条件(C)で分取高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に付し、得られる溶出液を実施例4記載の分析条件(c)でHPLC分析した。こうして得られた11107D物質を含む画分から、溶媒を留去することにより、11107D物質304mgを得た。

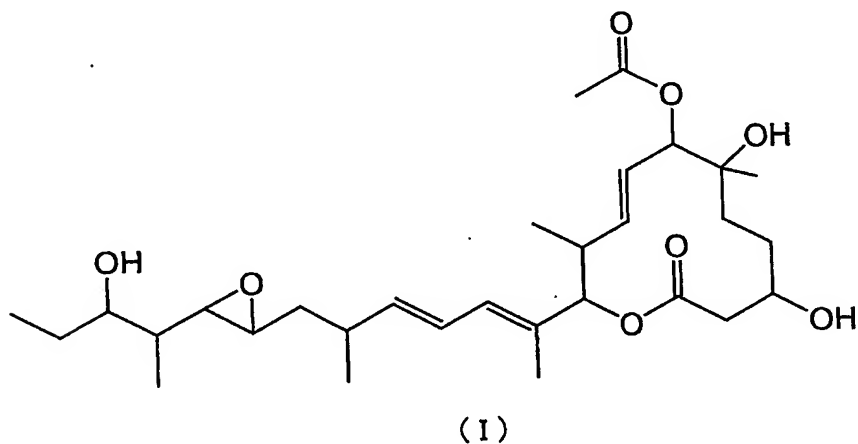
【書類名】 要約書

【要約】

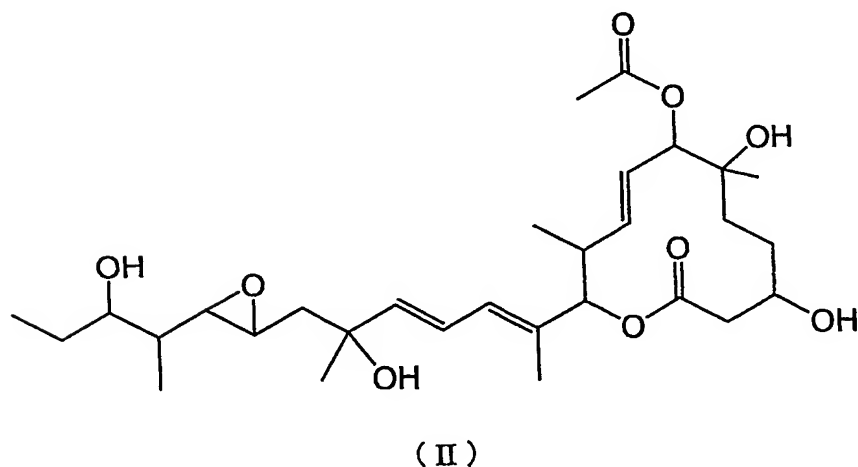
【課題】 抗腫瘍活性を有する12員環マクロライド系化合物11107D物質の生物学的変換による新規な製造方法の提供。

【解決手段】 出発原料である式(I)で示される12員環マクロライド系化合物11107B物質を、式(II)で示される11107D物質に変換する能力を有するストレプトミセス (*Streptomyces* sp.) 属に属する菌株(例えばストレプトミセス エスピー (Streptomyces sp.) AB-1704株 (FERM P-18999))、またはその培養菌体調製物および酸素の存在下、出発原料をインキュベーション処理し、その処理液から目的物である11107D物質を採取する。

【化1】



【化2】



【選択図】 なし

特願 2 0 0 2 - 3 4 6 7 9 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 0 0 0 2 1 7]

1. 変更年月日
[変更理由]
住 所
氏 名

1 9 9 0 年 8 月 2 9 日
新規登録
東京都文京区小石川4丁目6番10号
エーザイ株式会社

特願 2002-346796

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000001915]

1. 変更年月日

1990年 8月 8日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都中央区京橋1丁目5番8号

氏 名

メルシャン株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.